



TITLE:

# 尿酸酸化酵素を用いた尿中尿酸定量法について - Gas-chromatography 法との比較 -

AUTHOR(S):

山本, 逸夫; 柳川, 真; 山川, 謙輔; 川村, 寿一

---

CITATION:

山本, 逸夫 ...[et al]. 尿酸酸化酵素を用いた尿中尿酸定量法について - Gas-chromatography 法との比較 -. 泌尿器科紀要 1988, 34(3): 419-422

ISSUE DATE:

1988-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/119512>

RIGHT:

# 尿酸酸化酵素を用いた尿中尿酸定量法について

—Gas-chromatography 法との比較—

三重大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 川村寿一教授)

山本 逸夫, 柳川 真, 山川謙輔, 川村寿一

## THE DETERMINATION OF OXALATE IN URINE BY ENZYMATIC METHOD USING OXALATE OXIDASE: COMPARISON BETWEEN ENZYMATIC AND GAS- CHROMATOGRAPHIC METHODS

Itsuo YAMAMOTO, Makoto YANAGAWA,

Kensuke YAMAKAWA and Juichi KAWAMURA

From the Department of Urology, Mie University School of Medicine

(Director: Prof. J. Kawamura)

Urinary oxalate is one of the most important constituents of urolithiasis, but the determination of oxalate in urine has not been performed as a routine laboratory examination.

We tried to measure oxalate in urine by the enzymatic method with oxalate oxidase. The linearity of the standard curve and reproducibility of this method were confirmed. (Linearity:  $r=0.996$ , S.D./mean:  $0.5\sim3.6\%$ , recovery rate:  $99.5\pm3.3$  (mean $\pm$ S.D.) %) The correlation between this method and gas-chromatographic method was  $0.926$ . The enzymatic method with oxalate oxidase can be utilized for determining the urinary oxalate as a routine laboratory examination.

**Key words:** Urolithiasis, Oxalate in urine, Enzymatic method, Gas-chromatographic method

### 緒 言

上部尿路結石の約70%は、結石成分として尿酸カルシウムを含んでおり、尿酸カルシウム結石形成において、尿中尿酸量を測定することは尿中カルシウム量の測定とともにきわめて重要な意義をもつものと考えられる。当教室でも gas-chromatography 法により尿中尿酸の定量化を行ってきたが、今回、市山ら<sup>1)</sup> (1985) が発表した尿酸酸化酵素を用いた方法により尿中尿酸の測定をする機会を得たので、gas-chromatography 法との比較検討を行い若干の知見を得たので報告する。

### 測定原理および測定方法

#### 1. 市山法 (酵素法) について

測定原理は、尿中尿酸を尿酸酸化酵素で酸化させ、その際に生じる過酸化水素とペルオキシダーゼにより 3-methyl-2-benzothiazolinone (MBTH) と sodium N-sulfopropylaniline (HALPS) を重合させ、582

nm に吸光度のピークをもつ chromophore を生成させ、分光光度計での 582 nm の吸光度の増加から尿酸量を測定するというものである。測定に使用する試薬 (特級) はつぎのとおりである。

- 1) 6 N 塩酸
- 2) 1 N 水酸化ナトリウム
- 3) コハク酸
- 4) EDTA-Na
- 5) 尿酸ナトリウム
- 6) MBTH (和研薬)
- 7) HALPS (同仁化学研究所)
- 8) アスコルビン酸酸化酵素 (Ⅲ) (東洋紡)
- 9) Horse-raddish peroxidase (Grade I) (Boehringer)
- 10) 尿酸酸化酵素 (barley seeding) (Boehringer)
- 11) 活性炭 (Shirasagi) (武田薬品工業)
- 12) ステアリン酸

測定方法は、市山ら<sup>1)</sup>、野々村ら<sup>2)</sup> の論文に詳しい

ので参照されたい。なお、分光光度計は島津 UV-260 を用いた。

## 2. gas-chromatography 法について

測定原理は尿中尿酸を7% HCl-methanol でメチルエステル化し、chloroform で抽出したのち、gas-chromatography により定量化するというものである。測定に使用する試薬（特級）はつぎのとおりである。

- 1) 6 NHCl
- 2) conc. HCl
- 3) 7% HCl-methanol
- 4) caprylic acid-methanol
- 5) chloroform
- 6) Methanol
- 7) Oxalic acid ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

測定方法は柳川の論文<sup>3)</sup>に詳しいので参照されたい。

なお、gas-chromatograph は島津 GC-5A を使用した。

## 実験結果

### 1. 酵素法について

#### 1) 標準曲線

同一濃度6検体ずつ測定した結果、各濃度の平均値と optical density の関係 (standard curve) は直線となった ( $r=0.996$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 1)。

#### 2) 試量測定値の変動

9検体について求めた変動係数は  $2.49 \pm 0.97$  (S.D.)% であった (Table)。

#### 3) 回収試験

9検体に尿酸ナトリウム  $1.25 \mu\text{mol}$  を添加し、回収率を調べたところ、平均回収率は  $99.5 \pm 3.3$  (S.D.)% という良好な結果を得た (Table)。

## 2. Gas-chromatography 法について

### 1) 標準曲線

同一濃度4検体ずつ測定した結果、各濃度の平均値と Ox/IS の関係は直線となった ( $r=0.999$ ,  $p<0.01$ )。

### 2) 試量測定の変動

6検体について求めた変動係数は  $3.53 \pm 0.67$  (S.D.)% であった。

### 3) 回収試験

5検体に尿酸  $20 \text{ mg/l}$  を添加し回収率を調べたところ、平均回収率は  $98.4 \pm 8.1$  (S.D.)% であった。

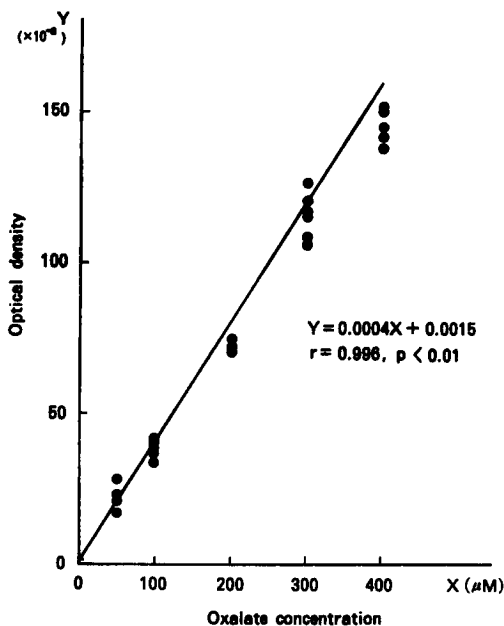


Fig. 1. The linearity of oxalate determination.

Table. Reproducibilities and recovery rates of oxalate in urine

	Reproducibility( $\mu\text{M}$ ) Mean $\pm$ S.D. (*)	S.D. Mean $\times 100$ (%)	Recovery rate(%) Mean $\pm$ S.D. (**)
Y. A.	259.8 $\pm$ 1.2	0.47	94.6 $\pm$ 4.5
J. T.	145.3 $\pm$ 5.1	3.54	102.9 $\pm$ 4.8
I. Y.	141.8 $\pm$ 4.0	2.82	97.6 $\pm$ 5.7
K. Y.	201.8 $\pm$ 3.7	1.82	95.1 $\pm$ 3.2
M. Y.	207.8 $\pm$ 4.4	2.10	100.4 $\pm$ 7.2
M. W.	162.3 $\pm$ 3.0	1.85	97.1 $\pm$ 2.7
G. B.	99.3 $\pm$ 3.3	3.35	100.8 $\pm$ 4.1
N. H.	80.8 $\pm$ 2.9	3.62	103.6 $\pm$ 3.2
K. A.	172.3 $\pm$ 4.9	2.84	103.4 $\pm$ 3.3
Mean $\pm$ S.D.		2.49 $\pm$ 0.97	99.5 $\pm$ 3.3

(\*) measured 5 times for each sample

(\*\*) measured 4 times for each sample

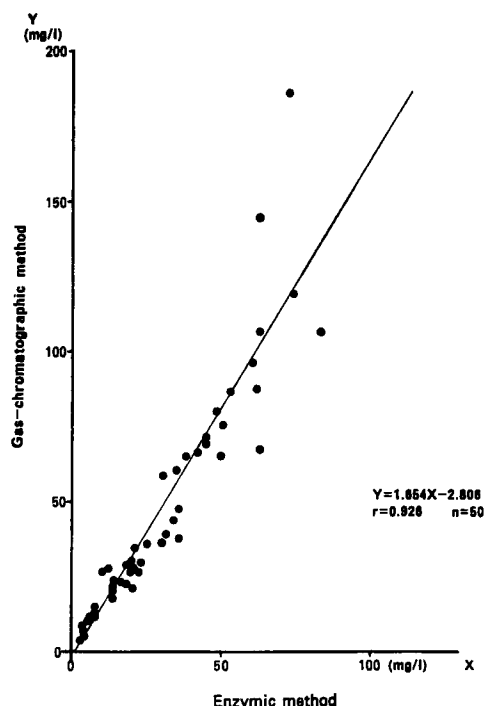


Fig. 2. Comparison between enzymatic and gas-chromatographic methods for determination of urinary oxalate.

### 3. 酵素法と Gas-chromatography 法との比較

50検体について両測定法で同時に測定した結果, 危険率1%以下の有意な相関関係が得られた (Fig. 2). Gas-chromatography 法の方が高めにでる傾向がみられた。

## 考 察

尿路結石症において尿中尿酸量を測定することはきわめて重要なこととされている。尿酸定量の歴史は古く, 種々の測定法が報告されており, つぎの6方法に大別できる。

- 1) 直接沈澱法
- 2) 溶剤抽出法
- 3) isotope dilution method
- 4) 酵素法
- 5) gas-chromatography 法
- 6) 尿酸電極の使用

1) 直接沈澱法としては Archer らの方法<sup>4)</sup>が代表的である。これは尿酸をカルシウム塩として沈澱させ, 過マンガン酸で滴定するものである。しかし, 尿中には尿酸カルシウムの沈澱を防げる作用をもつ Mg や polyphosphate が存在し, また尿酸カルシウムとともに沈澱し, 過マンガン酸と反応するクエン酸や尿酸

も存在するために測定値は不正確となる。このため Hodgkinson ら<sup>5)</sup>は尿を4倍希釈し, 尿酸をカルシウム塩と沈澱させた後, glycolic acid に還元し, この glycolic acid とクロモトロブ酸を反応させ分光光度計にて定量を行う Hodgkinson & Williams 法を報告している。

2) 溶剤抽出法とはエーテルで尿中尿酸を抽出し, その後カルシウム塩として沈澱させ, 過マンガン酸の滴定にて定量する方法であり, Yarbrow & Simpson 法<sup>6)</sup>で代表される。

3) isotope dilution method は, はじめ  $^{14}\text{C}$ -oxalate を用いて回収率を求めるために使用されたようであるが, Hockaday ら<sup>7)</sup>をはじめとして,  $^{14}\text{C}$ -oxalate の使用を 1) 直接沈澱法 2) 溶剤抽出法および 4) 酵素法などの方法に応用して非常に優れた結果を得ている。

4) 酵素法は fungus の *Colybia velutipes* より発見された oxalate decarboxylase を使用するもので, この酵素により尿酸は炭酸ガスとギ酸に分解される。この酵素を用いることにより Meyer ら<sup>8)</sup>および Ribeiro & Elliot<sup>9)</sup>は Warburg 検圧計を用いて産生される炭酸ガスを測定し尿酸量を求めた。

一方, 市山らの方法<sup>1)</sup>は oxalate oxidase を用いるもので, 尿中尿酸を酸化させその際に生じる過酸化水素とペルオキシダーゼにより chromophore を生成させ, 吸光度の増加より尿酸量を測定するというものである。

5) gas-chromatography による尿中尿酸の定量は 1966年 Dalglish ら<sup>10)</sup>によって行われたのが最初であろう。当教室の米田<sup>11)</sup>は Mee & Stanley の方法<sup>12)</sup>に準じ, 5% HCl-methanol にて尿酸をメチルエステル化し内部標準物質として caproic acid を加え gas-chromatography にて定量を試みた。さらに柳川は内部標準物質に caprylic acid を用い, メチルエステル化したのち, これをクロロホルムで抽出後 gas-chromatograph に注入するという方法<sup>3)</sup>により, 平均回収率  $99.14 \pm 1.31$  (S.D.)%, 全操作約2時間で尿中尿酸の定量を可能とした。

6) 尿酸電極を使用する方法は電極として silver-silver oxalate を用いるものであるが, 現在まで本法により尿中尿酸を測定したという報告はない。以上がおもな尿酸の定量法である。

本邦では, Snell & Snell の方法に改定を加えた竹内らの方法<sup>13)</sup>, 酵素法に isotope dilution method を応用した Bennett らの radioenzyme 法を改良した小川の方法<sup>14)</sup>, 高速液体クロマトグラフィーによる方法<sup>15-17)</sup>が報告されている。

当教室では主として gas-chromatography 法により尿酸量の定量化を行っていたが、市山らの開発した酵素法による尿酸量の測定を行う機会を得たので、同一被検尿における gas-chromatography 法と酵素法の比較検討を行った。酵素法に比べ、gas-chromatography 法での測定値の方が約1.7倍高く出るようである。柳川はその論文の中で、尿中に存在する種々の物質のなかである物質が gas-chromatography 法の操作過程において尿酸に分解される可能性を指摘しており<sup>2)</sup>、両者間の差がどうして生じたのかは今後の検討課題と考えられる。

最近、鈴木ら<sup>18)</sup>は尿酸酸化酵素を利用した尿酸測定キット (Sigma 社) の有用性を報告し、modified Hodgkinson and Williams 法および ion chromatography 法とよい相関を示し、それぞれの相関係数は0.833, 0.796であったと述べている。また、尿酸酸化酵素を用いた尿酸測定キットでの測定値に比べ、modified Hodgkinson and Williams 法の方が高値を示したとも述べている。

市山法は、われわれが行ってきた gas-chromatography に比べ1検体の測定が約1時間で完了すること、また1度に多数の検体が同時測定できることなどの特色があり、今後、同方法で尿中尿酸を測定していく予定である。

## ま と め

1) 尿酸酸化酵素を用いた尿中尿酸定量法 (市山法) を検討した。変動係数は $2.49 \pm 0.97$  (S.D.) %, 回収率は $99.5 \pm 3.3$  (S.D.) %であり、操作が簡便であるばかりでなく、非常に精度の高い方法であることが判明した。

2) 同一被検尿について、酵素法と gas-chromatography 法を同時に測定した結果、両者に危険率1%以下の有意な相関関係が得られた。

## 文 献

- 1) Ichiyama A, Nakai E, Funai T, Oda T and Katafuchi R: Spectrophotometric determination of oxalate in urine and plasma with oxalate oxidase. *J Biochem* **98**: 1375-1385, 1985
- 2) 野々村光生, 岡田裕作, 川村寿一, 吉田 修, 市山 新: 尿酸酸化酵素を用いた新しい尿中尿酸定量法 (市山法) について. *泌尿紀要* **31**: 397-405, 1985
- 3) 柳川 真: 尿路結石症に関する研究. I. Gas-chromatography による尿中尿酸定量法. *三重医学* **26**: 225-230, 1982
- 4) Archer HE, Dormer AE, Scowen EF and Watts RWE: Studies on the urinary excretion of oxalate by normal subjects. *Clin Sci* **16**: 405-411, 1957
- 5) Hodgkinson A and Williams A: An improved colorimetric procedure for urine oxalate. *Clin Chim Acta* **36**: 127-132, 1972
- 6) Yarbrow CL and Simpson RE: The determination of total urinary oxalate. *J Lab Clin Med* **48**: 304-310, 1956
- 7) Hockaday TDR, Frederick EW, Clayton JE and Smith LH: Studies on primary hyperoxaluria. II. Urinary oxalate, glycolate and glyoxylate measurement by isotope dilution methods. *J Lab Clin Med* **65**: 677-687, 1965
- 8) Mayer GG, Markow D and Karp F: Enzymatic oxalate determination in urine. *Clin Chem* **9**: 334-339, 1963
- 9) Ribeiro ME and Elliot JS: Direct enzymatic determination of urinary oxalate. *Invest Urol* **2**: 78-81, 1964
- 10) Dalgliesh CE, Horning EC, Horning, MG, Knox KL and Yarger K: A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochem J* **101**: 792-810, 1966
- 11) Komeda Y, Hohnoki S, Yanagawa M, Horiuchi E and Tada S: Gas-chromatographic determination of urinary oxalate and its comparison with the colorimetric method. *Mie Med J* **31**: 527-531, 1982
- 12) Mee JM and Stanley RW: A rapid gas-liquid chromatographic method for determining oxalic acid in biological materials. *J Chromatogr* **76**: 242-243, 1973
- 13) 竹内秀雄, 岡田裕作, 吉田 修: 簡単な尿中尿酸の測定法. *泌尿紀要* **27**: 505-508, 1981
- 14) 小川由英: 尿路結石症における尿酸に関する研究. I. Radioenzyme 法による尿中尿酸の測定. *日泌尿会誌* **72**: 694-700, 1981
- 15) Hughes H, Hagen L and Sutton L: Determination of urinary oxalate by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **119**: 1-3, 1982
- 16) 戎野庄一, 北川道夫, 森本鎮義, 宮崎善久, 南方茂樹, 安川 修, 大川順正: 尿路結石症における尿酸代謝の研究. I. High performance liquid anion exchange chromatography による尿中尿酸の測定. *日泌尿会誌* **74**: 1598-1605, 1983
- 17) 杉本俊門, 西尾正一, 南川正信, 早原信行, 今岡進, 船江良彦: 高速クロマトグラフィーによる尿中尿酸測定法について. *泌尿紀要* **29**: 287-292, 1983
- 18) 鈴木孝治, 百成智津枝: 尿中尿酸測定キット (Sigma 社) の有用性. *泌尿紀要* **33**: 794-798, 1987

(1987年11月2日迅速掲載受付)